

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：33910

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H03011

研究課題名(和文) 医工学的解析に基づく筋-神経間のクロストークの分子基盤

研究課題名(英文) Biomedical engineering-based analysis of the molecular mechanisms underlying functional crosstalk between muscle and neurons.

研究代表者

片野坂 公明 (KATANOSAKA, Kimiaki)

中部大学・生命健康科学部・准教授

研究者番号：50335006

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：骨格筋機能の維持には、筋と筋感覚神経の機械刺激に対する応答が重要だが、その詳細は不明である。本研究では、筋感覚神経の機械刺激受容メカニズムの解明により、神経-筋の相互作用の分子基盤を解明することを目的とし、筋感覚神経細胞の機械応答の解析系の構築、筋痛耐性の分子機構の解析、骨格筋特異的および神経特異的な機械刺激感受性分子(メカノセンサー)の欠損マウスの作成と解析を実施した。その結果、筋感覚神経と筋の機械刺激の受容応答に必須のメカノセンサーを明らかにすることができた。本成果は、将来的に、運動器障害や筋性疼痛を緩和する治療法の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Mechanotransduction is important to maintain the muscle functions. However, its molecular basis remains largely elusive. The aims of this study were to reveal mechanisms of mechanotransduction of muscle and innervated sensory neuron, and to understand their functional interaction. We constructed an experimental system to characterize the cellular mechanical responses of cultured muscle sensory neurons. We also analyzed molecular mechanisms of adaptive effect of the repeated bout of exercise on muscle pain, and examined the phenotypes of skeletal muscle-specific or sensory neuron-specific knockout mice of a mechanosensor. We found that this molecule is essential for mechanotransduction of the muscle sensory neuron and myocyte. In addition, we found that a membrane repair protein was increased in the muscle after exercise, suggesting its adaptive effect on muscle pain. These results might support to develop the preventive care of locomotive syndrome and pain relief.

研究分野：感覚生理学

キーワード：骨格筋 侵害受容器 一次知覚神経 メカノバイオロジー メカノセンサー 筋肉痛

1. 研究開始当初の背景

骨格筋による精緻な運動調節や姿勢の維持には、筋に分布する感覚神経(筋感覚神経)が筋の伸縮による機械的ストレス(メカニカルストレス)を正確に感知し、筋自身の動きへとフィードバックする巧妙な制御システムが重要である。また、過剰な運動や筋損傷は、筋感覚神経の機能亢進を介して痛みを生じ、危機回避という形で筋機能の回復を支えている。しかし、筋感覚神経が筋の伸縮に伴うメカニカルストレスを感知するしくみは不明である。

2. 研究の目的

本研究では、筋固有感覚を担う筋紡錘・腱器官などの伸張受容器、および筋痛覚受容器のメカニカルストレス感知機構の解明を核として、メカニカル刺激を介した神経と筋の間の相互作用に関する分子的基盤を解明することを目的とする。これにより、運動器障害(ロコモティブシンドローム)や、筋の痛みを緩和する新しい治療法の開発につながる基盤的知識の確立を目指す。

3. 研究の方法

本研究では、メカノセンサーの候補タンパク質のひとつである、transient receptor potential vanilloid type 2 (TRPV2)イオンチャネルについて、これを組織特異的に欠損したノックアウトマウス(KOマウス)の系統を確立した。これらのメカノセンサーKOマウスについて、その表現型の解析を中心に、独自に開発した多階層からの医工学的生体評価システムを用いて、以下に示す実験を実施した。

- (1)筋および腱の組織および支配神経におけるメカノセンサー分子の発現と応答解析による細胞のキャラクタリゼーションと細胞タイプの同定

- (2)組織特異的メカノセンサーKOマウスの作成とその表現型解析
- (3)生体へのメカニカル刺激に対する動物行動の解析
- (4)機械受容細胞のメカノトランスダクション機構解明のための細胞応答解析
- (5)繰り返し運動時の筋肉痛耐性の分子機構の解析

4. 研究成果

(1) 培養脊髄神経節細胞を用いた筋感覚ニューロンの機械応答のキャラクタリゼーション

マウスの筋痛覚受容器および筋紡錘・腱器官の受容器ニューロンの標識を実施し、初代培養での識別を試みた。深麻酔下の野生型マウスの後肢の筋に、蛍光色素 DiI 溶液の注入または DiI の結晶の留置を行ない、脊髄神経節細胞を単離培養したのち、逆行性に染色されたニューロンを観察した。培養下では標識された神経細胞の数は極めて少なく、マウスの個体差が大きいことから、現在も引き続き、色素の投与方法および投与時間等の検討を行っている。しかしながら、細胞サイズやマーカー分子の違いから、細胞タイプの同定に繋がる情報が得られつつある。さらに、逆行性標識した感覚ニューロンの培養条件を検討し、カルシウムイメージング法とパッチクランプ法により機械応答の計測を試みているが、研究期間内には陽性応答を記録できなかった。引き続き、細胞単離・培養条件を検討し、この細胞に細胞伸展刺激を負荷した際の機械応答の記録を行い、細胞の機能的特徴を明らかにしていく予定である。

(2) 繰り返し運動時の筋痛耐性の分子機構の解析

筋痛覚は筋機械感覚の一種であるが、その発症に関しては不明な点も多い。例えば、不慣れな運動後に、遅発性の筋痛が生じること

はよく知られているが、筋痛からの回復後に繰り返し運動を実施した際には筋痛が生じにくく、そのしくみは不明である。そこで、この“筋痛耐性(repeated bout effect)”のメカニズムを調べる目的で、筋細胞膜タンパク質のプロテオーム解析を開始した。筋痛を生じやすい伸張性収縮運動を負荷した筋と、運動を負荷していない筋から細胞膜タンパク質を精製し、電気泳動によりタンパク質発現の増減を比較解析した。その結果、運動5日後の筋において、複数の膜タンパク質発現に増加傾向が観察された。そこでまず、筋の細胞膜構造の支持と修復に関わる複数の筋特異的膜タンパク質に注目して、ウエスタンブロッティング法、定量的 RT-PCR 法および免疫組織化学法により、各タンパク質の筋での発現量と組織局在変化を、運動の有無で比較した。その結果、細胞膜損傷の修復に関与するあるタンパク質の発現が運動後に有意に増加していることを見出した。この結果から、細胞膜修復能の増大が筋痛耐性の形成に関わっている可能性が示唆され、筋の機能維持と筋痛覚の関わりについて、その一端を明らかにできた。

(3) 骨格筋・神経細胞特異的なメカノセンサー分子 KO マウスの表現型の解析

メカノセンサー分子の候補として知られる TRPV2 について、筋機能・神経機能への関与を調べた。TRPV2 の感覚神経特異的欠損マウス、同じく TRPV2 の筋特異的欠損マウス、侵害受容器の痛み刺激受容体 TRPV1 の欠損マウスから単離培養した感覚ニューロンの機械応答をカルシウムイメージング法により調べた。さらに、上記の遺伝子欠損マウスで行動試験を実施し、感覚・運動・姿勢制御へのこれらの因子の関与を調べた。その結果、TRPV2 は機械的痛覚に関与しており、触覚には関与しないことが明らかとなった。また、TRPV2 の骨格筋細胞特異的 KO マウ

スを用いて、その骨格筋における筋細胞数・横断面積・構成細胞(遅筋・速筋)比・組織学的解析・運動能力などのキャラクタリゼーションを行った。また、KO マウスから単離した筋幹細胞および筋繊維細胞を用いて、機械刺激に対する生理応答を詳細に解析した。この結果から、筋細胞におけるメカノセンサー TRPV2 の生理的役割の一端を明らかにすることができた。今後、これらの遺伝子改変マウスを用いて、筋肉痛および運動・姿勢制御へのこれらの関与を調べる予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

Ota, H., Katanosaka, K., Murase, S., Furuyashiki, T., Narumiya, S., Mizumura, K., EP2 receptor plays pivotal roles in generating mechanical hyperalgesia after lengthening contractions., *Scand J Med Sci Sports* 28(3):826-833. (2018), (査読有), DOI: 10.1111/sms.12954

Hayashi, K., Katanosaka, K., Abe, M., Yamanaka, A., Nosaka, K., Mizumura, K., Taguchi, T., Muscular mechanical hyperalgesia after lengthening contractions in rats depends on stretch velocity and range of motion., *European Journal of Pain* 21(1):125-139, (2017), (査読有), DOI:10.1002/ejp.909.

Takagishi, Y., Katanosaka, K., Mizoguchi, H., Murata, Y., Disrupted axon-glia interactions at the paranode in myelinated nerves cause axonal degeneration and neuronal cell death in the aged Caspr mutant mouse shambling., *Neurobiology of Aging* 43:34-46, (2016), (査読有), DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2016.03.020

片野坂公明, 水村和枝, 温度感覚と熱痛覚の末梢メカニズム, 中部大学生命健康科学研究所紀要 Vol.11 (2015), (査読有), URL: http://www3.chubu.ac.jp/research_life_health/

〔学会発表〕(計 7 件)

Hibino, Y., Katanosaka, Y.,
Mizumura, K., Katanosaka, K.,
Analysis of changes in expression
level of sarcolemmal proteins after
exercise in a rat model for delayed
onset muscle soreness (DOMS). 第
95 回日本生理学会大会, 2018

Katanosaka, K., Hibino, Y., Tamaki
S., Katanosaka, Y., A new method to
examine animal tactile sensation
and its practical application to the
analysis of a primary sensory
neuron-specific gene knockout
mouse. 日本比較生理生化学会第 39 回
大会, 2017

Wakatsuki, K., Matsubara, T.,
Katanosaka, K., Yamanaka, A.,
Nishijo, H., Mizumura, K., Taguchi, T.,
Peripheral pain mechanisms via
neurotrophic factors in a rat
reserpine-induced fibromyalgia model.,
第 94 回日本生理学会大会, 2017

Katanosaka, K., Takatsu, S.,
Mizumura, K., Naruse, K.,
Katanosaka, Y., The role of transient
receptor potential vanilloid 2 (TRPV2)
in mechanosensation of adult mice. , 日
本比較生理生化学会第 38 回大会, 2016

水村和枝、林 功栄、片野坂公明、田口
徹、伸張性筋運動は筋損傷を伴わずに筋
細胞/衛生細胞の痛覚感作物質産生を増
大させ、遅発性筋痛を生じる。第 2 回日
本筋学会学術集会, 2016

Hayashi, K., Katanosaka, K., Abe, M.,
Yamanaka, A., Mizumura, K., Taguchi,
T., Nerve growth factor-mediated
mechanism, but not muscle damage, is
required for the induction of delayed
onset muscle soreness in rats. 第 38 回
日本神経科学会, 2015

Katanosaka, Y. and Katanosaka, K.
TRPV2 is crucial for cardiac structure
and function Gordon Research
Conferences, Muscle: Excitation-
Contraction Coupling, 2015

〔図書〕(計 1 件)

片野坂公明、水村和枝：化学同人、「メ
カノバイオロジー 細胞が力を感じ応答す
るしくみ (DOJIN BIOSCIENCE SERIES)」、曾

我部正博編、第 16 章 痛みのメカノバイロ
ジー：機械刺激と痛み、pp.203-216、2015

〔その他〕
ホームページ等

[http://www.chubu.ac.jp/about/faculty/profil
e/e38e3bb33c48f5abf808a528fe9137979809
b01f.html](http://www.chubu.ac.jp/about/faculty/profil
e/e38e3bb33c48f5abf808a528fe9137979809
b01f.html)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

片野坂 公明 (KATANOSAKA, Kimiaki)
中部大学・生命健康科学部・准教授
研究者番号：50335006

(2) 研究分担者

水村 和枝 (MIZUMURA, Kazue)
中部大学・生命健康科学部・教授
研究者番号：00109349

片野坂 友紀 (KATANOSAKA, Yuki)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科
・助教

研究者番号：60432639
(2015 年度のみ)

(4) 研究協力者

日比野 雄平 (HIBINO, Yuhei)
清水 理絵 (SHIMIZU, Rie)